



#6
Patent
2896-4005

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant(s) : Lexun Xue et al.
Serial No. : 09/997,445
Filing Date : November 29, 2001
Group Art Unit: : ~~TBA~~ 1678
For : Transgenic Dunaliella Salina As a Bioreactor

Helmer

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 2031

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENT

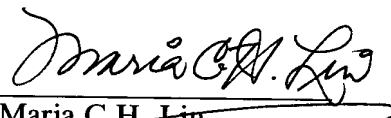
Sir:

Enclosed herewith are certified copies of the Chinese application nos.

- | | | |
|----|------------|-----------------------------|
| 1. | 00131217.0 | Filed December 3, 2000; and |
| 2. | 01128486.2 | Filed September 21, 2001 |

to support the claim of priority.

Respectfully submitted
MORGAN & FINNEGAN



Maria C.H. Lin
Registration No. 29,323

Date: April 15, 2002

Morgan & Finnegan
345 Park Avenue
New York, New York 10154
Tel. No. (212) 758-4800
Fax. No. (212) 751-6849



证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2000 12 03

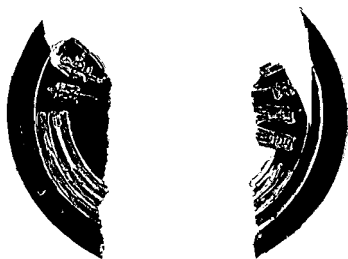
申 请 号： 00 1 31217.0

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 转基因盐藻生物反应器

申 请 人： 薛乐勋

发明人或设计人：薛乐勋；潘卫东；姜国忠；郑合明；张贵星；吕玉民；鲁照明；王建民；牛向丽；王筠；陈占宽；王建人；杜保华



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2002 年 3 月 5 日

权 利 要 求 书

1、一种转基因盐藻生物反应器，其特征在于：它含有外源目的基因和特定的筛选标记基因，并能高效表达外源目的基因，是利用转基因技术方法，将外源目的基因导入盐藻，并通过筛选标记建立转基因盐藻藻株，以此制备或生产目的基因产物。

2、根据权利要求 1 所述的转基因盐藻生物反应器，其特征在于：利用转基因技术中的生物学法，例如农杆菌 Ti 质粒转化系统、植物病毒载体介导的转化技术，将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达，以获得转基因盐藻藻株。

3、根据权利要求 1 所述的转基因盐藻生物反应器，其特征在于：利用转基因技术中的物理和化学方法，例如聚乙二醇(PEG)、脂质体法、电激法、超声波导入法、基因枪法、显微注射法、紫外激光微束法、玻璃珠搅拌法、气溶胶基因导入法，将外源性目的基因导入盐藻细胞并得到表达，以获得转基因盐藻藻株。

4、根据权利要求 1 所述的转基因盐藻生物反应器，其特征在于：外源目的基因为来自人或哺乳动物的基因，如血管抑素、内皮抑素、血红蛋白、人凝血因子Ⅲ、人红细胞生成素、干扰素、肥胖蛋白、人白细胞介素、人粒细胞集落刺激因子、人巨噬细胞集落刺激因子、链激酶、人蛋白激酶、生长激素、组织血纤维蛋白溶酶原激活因子、唾液酸醛缩酶、防御素、肿瘤坏死因子、表皮生长因子、牛凝乳乳蛋白酶。

5、根据权利要求 1 所述的转基因盐藻生物反应器，其特征在于：外源目的基因为来自植物的基因，如超甜定、种子储藏蛋白基因。

6、根据权利要求 1 所述的转基因盐藻生物反应器，其特征在于：外源目的基因为来自昆虫的基因，如抗菌肽基因。

7、根据权利要求 1 所述的转基因盐藻生物反应器，其特征在于：外源目的基因为来自微生物的基因，如杀幼蚊毒素基因、细胞分裂素生物合成基因、内切几丁质酶基因、葡萄糖淀粉酶 P 基因。

8、根据权利要求 1 所述的转基因盐藻生物反应器，其特征在于：筛选标记为以下物质之一，aadA 基因编码的壮观霉素/链霉素抗性，cat 基因编码的氯霉素抗性，npt II/neo 基因编码的卡那霉素/新霉素抗性，Hyg^r 基因编码的潮

霉素抗性。

9、根据权利要求 1 所述的转基因盐藻生物反应器，其特征在于：利用本发明的转基因盐藻可制备或生产人或兽用疫苗。

说明书

转基因盐藻生物反应器

本发明涉及基因工程领域，尤其是一种建立转基因盐藻生物反应器的方法。

众所周知，植物作为生产药用蛋白的生物反应器，为人类提供了一个更加安全和廉价的生产系统。与微生物发酵和转基因动物等生产系统比较，它具有许多优点：1、一些微生物系统不能对真核生物蛋白进行准确的翻译后加工和蛋白糖基化；大肠杆菌发酵过程常常产生一些不溶性聚合物，而将这些聚合物重新溶解并折叠成天然蛋白质，难度极大；此外发酵常需要庞大的设备投资。2、动物细胞培育所需费用昂贵，用转基因动物生产重组蛋白，可能会污染动物病毒，这对人类可能造成潜在威胁。植物病毒不会感染人类，故用转基因植物生产重组蛋白更为安全。3、植物细胞培养不需要昂贵培养基和复杂的纯化系统，也不需要严格无菌的生产条件和冷藏保存。

盐藻(*Dunaliella salina*)，属绿藻门团藻目多鞭毛藻科。为单细胞真核生物，个体呈梨形或椭圆形，细胞体积 $50-1000 \mu\text{m}^3$ 。具有 2 条长鞭毛，可自由游动。盐藻细胞与其它一些单细胞真核藻类最大的不同点是它缺乏细胞壁，细胞外仅包被一薄层弹性浆膜。藻体内有一杯状叶绿体，内含一个造粉核。藻体前端有一红色眼点。其繁殖主要靠细胞纵裂的无性繁殖，有性生殖为同配接合。盐藻是目前所知耐盐性最强的单细胞真核生物，生长在海水或咸水湖等高盐环境下，由于无细胞壁可通过快速的细胞体积变化来适应细胞外渗透压的变化。因此对环境适应性极强，可在低浓度(0.2%)和接近饱和的高浓度(35%)盐水中生长。盐藻具有很强的光合作用能力，能利用水和空气中的二氧化碳在阳光照射下合成蛋白质等多种有机物，因此盐藻的养殖容易，成本低廉。

本发明的目的在于建立一种新型高效转基因盐藻生物反应器，将来自微生物、动物和植物的外源基因，通过目前国际上公认较为成熟的遗传转化技术(电激法，PEG 法，基因枪法等)导入盐藻细胞中，使其表达，建立盐藻生物反应器，用来制备或生产多种贵重的药用蛋白及人和兽用疫苗。

本发明以盐藻为宿主，通过转基因技术将外源目的基因导入盐藻细胞中，建立转基因盐藻生物反应器系统，通过转基因盐藻细胞的大量繁殖，制备或生

产目的基因的产物。

本发明的目的是通过以下方式来实现的：

本发明的转基因盐藻生物反应器，它含有外源目的基因和待定的筛选标记基因，并能高效表达外源目的基因，是利用转基因技术方法，将外源目的基因导入盐藻，并通过筛选标记建立转基因盐藻藻株，以此制备或生产目的基因产物。

在本发明中，可通过转基因技术中的遗传转化生物学方法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达，以获得转基因盐藻藻株。也可用物理和化学方法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达，以获得转基因盐藻藻株。

所述的生物学方法可为用农杆菌 Ti 质粒转化系统将外源性目的基因导入盐藻细胞并得到表达；也可为用植物病毒载体系统将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。

所述的物理和化学方法可为下列方法中的任意一种：

- a、用 聚乙二醇 (PEG) 处理法将外源 目的基因导入盐藻细胞并得到表达。
- b、用脂质体法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。
- c、用电激法将外源性目的基因导入盐藻细胞并得到表达。
- d、用超声波导入法将外源 目的基因导入盐藻细胞并得到表达。
- e、用基因枪法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。
- f、用显微注射法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。
- g、用紫外激光微束法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。
- h、用玻璃珠搅拌法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。
- i、用气溶胶基因导入法将外源目的基因导入盐藻细胞并得到表达。

本发明中，外源目的基因可为来自人或哺乳动物的基因，如血红蛋白、人凝血因子Ⅲ、人红细胞生成素、干扰素、肥胖蛋白、人白细胞介素、人粒细胞集落刺激因子、人巨噬细胞集落刺激因子、链激酶、人蛋白激酶、生长激素、组织血纤维蛋白溶酶原激活因子、唾液酸醛缩酶、防御素、血管抑素、内皮抑素、肿瘤坏死因子、表皮生长因子、牛凝乳乳蛋白酶等。

外源目的基因可为来自植物的基因，如超甜定、种子储藏蛋白。

外源目的基因还可为来自昆虫的基因，如抗菌肽。

外源目的基因也可为来自微生物的基因，如杀幼蚊毒素、细胞分裂素生物合成、内切几丁质酶、葡萄糖淀粉酶 P。

利用本发明的转基因盐藻可制备或生产人或兽用疫苗，如乙肝表面抗原 (HBsAg)， α -天花粉蛋白，流感病毒血凝素，爱滋病毒抗原 (HIV-1gp120)，疟疾抗原，口蹄疫病毒抗原；以及植物激素等生物活性物质。

筛选标记可用下列物质之一，aadA 基因编码的壮观霉素/链霉素抗性，cat 基因编码的氯霉素抗性，npt II/neo 基因编码的卡那霉素/新霉素抗性，Hyg^r 基因编码的潮霉素抗性。

本发明以转基因盐藻为生产药用蛋白的生物反应器，具有以下特点：1、盐藻为单细胞真核生物，无细胞壁，细胞内有一个大的叶绿体，易于遗传操作，有利于外源基因的转化，而且不会发生基因沉默。2、母系遗传，不会对环境造成危害。3、培养条件简单，生长快，生产成本低，易于工业化生产。4、盐藻细胞无毒性，基因工程下游产品纯化过程简便。5、该系统可用于生产多种生物活性物质。

本发明涉及以盐藻为宿主，通过转基因技术中的生物学或化学和物理学方法，将外源目的基因导入盐藻细胞，并通过筛选标记，获得转基因盐藻，使其成为新型高效生物反应器。通过转基因盐藻细胞的大量繁殖，可以廉价生产许多人用和兽用药物或疫苗、植物激素及其他生物活性物质。其特点是：由于盐藻无细胞壁，细胞内有一个大的叶绿体，易于遗传操作，有利于外源基因的转化；盐藻为单细胞真核生物，表达产物可糖基化、磷酸化等，有利于免疫原性和生物活性维持；易于培养，生长快，生产成本低；盐藻细胞无毒性，基因工程下游产品纯化过程较简便。

本发明主要包括四方面技术：1、盐藻培养技术。2、盐藻表达载体构建，权利要求书 4-7 项所描述的各种外源基因均可单独构建盐藻基因组表达载体、叶绿体表达载体和自主复制表达载体三种表达载体中的一种或几种联合。3、将外源基因导入盐藻的技术。4、转基因盐藻的筛选。

附图为本发明中肿瘤坏死因子 (TNF) 叶绿体表达载体 p64-TNF-AAD 的构建
本发明结合以下实施例做进一步描述，但并不限制本发明。

实施例

一、盐藻培养技术

1、液体培养：藻种接种于 Mclachlan 培养液，培养条件如下：温度 20-30℃，光照强度 3000 勒克司，每天光照培养 14 小时，黑暗培养 10 小时。

2、固体培养：Mclachlan 培养液中加入琼脂浓度为 0.5-0.8%，于超净台用

消毒白金耳从液体培养液取藻种立即接种到固体培养基面上, 置恒温箱内培养, 恒温箱中需配置荧光管照射, 按液体培养条件要求进行培养。

二、肿瘤坏死因子 (TNF) 叶绿体表达载体 p64C-TNF-AAD 的构建

(1) 载体 pSK-atpX 上克隆有叶绿体 atpA 的 5' 启动子序列和 rbcL 的 3' 终止子序列, 可以在叶绿体中高效表达插入的外源基因。质粒 pUC19-TNF 上含有人肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的 cDNA 基因片断, 长度约为 600bp, 两端分别为 BamH I 和 Xba I 酶切位点, 将载体 pSK-atpX 和质粒 pUC19-TNF 均用 BamH I 和 Xba I 双酶切割后, 将 TNF- α 的 cDNA 基因片断插入到 pSK-atpX 上 atpA 的 5' 启动子序列和 rbcL 的 3' 终止子序列之间, 构成含有人 TNF- α 基因表达盒 (atpA5'-TNF-rbcL3') 的中间载体 pSK-atpX-TNF。

(2) 载体 p64C 上克隆有叶绿体同源片段 clpP-trnI-petB 基因及 chlL 基因的 5' 和 3' 非编码区。将载体 p64C 和第 (1) 项得到的中间载体 pSK-atpX-TNF 均用 EcoR V 和 Sac I 双酶切割后, 将切下的 TNF- α 基因表达盒插入到 p64C 中, 构成叶绿体中间表达载体 p64C-atpX-TNF。其中 TNF- α 基因表达盒位于 chlL 和 atpA 的双重启动子下游, 使 TNF- α 基因增强表达。

(3) 载体 pUC-atpX-AAD 上克隆有 aadA 基因表达盒 (atpA5'-aadA-rbcL3'), 可以表达氨基糖苷-3'-腺苷酸转移酶 (壮观霉素抗性选择标记)。将载体 pUC-atpX-AAD 以 EcoR V 和 Sac I 双酶切割, 切下 1.9kb 的 aadA 基因表达盒, 同时将第 (2) 项得到的叶绿体中间表达载体 p64C-atpX-TNF 用 Not I 切割后经 T₄ DNA 聚合酶补成平端, 再用 Sac I 切割, 最后将 aadA 基因表达盒插入到 p64C-atpX-TNF 中, 构成叶绿体表达载体 p64C-TNF-AAD (如图所示), 其中含有人 TNF- α 基因表达盒 (atpA5'-TNF-rbcL3') 和 aadA 基因表达盒 (atpA5'-aadA-rbcL3'), 且 TNF- α 基因表达盒直接位于 chlL5' 下游, 使 TNF- α 基因在 chlL 和 atpA 的双重启动子作用下得到增强表达, 同时 aadA 基因表达盒可表达壮观霉素抗性, 便于重组子的筛选。

三、将外源目的基因导入盐藻

1. 用电激法将外源目的基因导入盐藻

取培养第 5 天的盐藻培养液, 1000rpm 离心 15min, 弃上清, 用含有 0.2M 甘露醇和 0.2M 山梨醇液处理后加入电激缓冲液, 调整盐藻密度在 10^8 个/ mm^3 。继之加入终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的含外源基因的质粒及 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的鲑精 DNA, 混匀后, 置冰上 5-10min, 吸取 0.5ml 置于轰击小室中待用。电激仪 (Backon 2000

型)电激时电压为 9.5KV,每次电激时间为 0.05 μ s,次数为 2^{10} ,循环次数 100 次,电激高度 2mm,每次电激间隔时间为 62.5sec。

2、用基因枪法将外源目的基因导入盐藻

取培养第 5 天的盐藻培养液,1000rpm 离心 15min,弃上清,用盐藻培养液将盐藻密度调整在 10^8 个/ mm^3 ,再取 0.5ml 盐藻培养液铺于含抗生素的固体培养基中央,直径为 3cm 的圆形有效轰击范围内,置超净台下吹干待用。

在无菌条件下,用基因枪(Bio-Rod 公司产的 PDS-1000 型)轰击。具体步骤如下:取 50 μ l (60 μ g/ml)金粉悬浮液加入 6 μ g 含有外源基因的质粒以及 50 μ l 2.5M CaCl_2 和 20 μ l 0.1M 亚精胺,振荡 3min,12000rpm 离心 10 sec,弃上清。用无水乙醇洗一次,振荡,12000rpm 离心,弃上清,共二次。最后将附有金粉的质粒悬浮于 60 μ l 无水乙醇中。每次轰击取 6-8 μ l,每皿轰击 3 次,轰击后将培养皿放入盐藻适宜培养条件下培养。

3、用 PEG 法将外源目的基因导入盐藻

取 0.5ml 盐藻培养液(细胞密度 10^7 - 10^8 个/ml),在超净台内接种于含抗生素的固体培养基上,直径为 3cm,吹干待用。

构建携带外源目的基因的农杆菌 Ti 质粒和盐藻细胞原生质体。尔后将新制备的原生质体悬浮液与 Ti 质粒 DNA 一起保温培养,同时加入分子量 4000-6000 的 PEG,在 pH8-9 下促进原生质体摄取 DNA,从而使细胞转化,为促进转化,在转化培养时加入运载 DNA(小牛胸腺 DNA),培养后离心收集原生质体,并重新悬浮到原生质体培养基中继续培养。

四、转基因盐藻的筛选

取电激法、基因枪法或 PEG 介导基因转化法的盐藻细胞团,铺于含有适当选择标记的固体培养基上进行筛选培养。在适宜培养条件,2-4 周后出现若干藻落,再将此藻落悬浮培养于不含抗生素的液体培养液中,3-5 天后再在抗生素的固体培养基上进行二次筛选,以后经 10 次以上继代培养,即可大量繁殖。

说明书附图

